

BEST AVAILABLE COPY

PCT/JP2004/005250

13. 4. 2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 4 月 1 5 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 1 1 0 8 7 7
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 1 1 0 8 7 7]

REC'D 03 JUN 2004	
WIPO	PCT

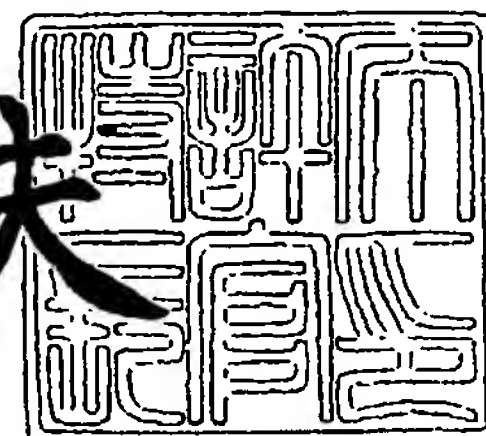
出 願 人 日本エンバイロケミカルズ株式会社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 5 月 2 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 A5913

【あて先】 特許庁長官殿

【提出日】 平成15年 4月15日

【国際特許分類】 C12N 15/11
G01N 33/53
C07K 16/00

【発明者】

【住所又は居所】 神戸市東灘区本山北町 4 丁目 1 9 番 1 号 神戸薬科大学
内

【氏名】 小林 典裕

【発明者】

【住所又は居所】 大阪市淀川区十三本町 2 丁目 1 7 番 8 5 号 日本エンバ
イロケミカルズ株式会社 研究開発部内

【氏名】 郷田 泰弘

【発明者】

【住所又は居所】 大阪市淀川区十三本町 2 丁目 1 7 番 8 5 号 日本エンバ
イロケミカルズ株式会社 研究開発部内

【氏名】 廣部 将人

【特許出願人】

【住所又は居所】 大阪府中央区道修町二丁目 3 番 8 号

【氏名又は名称】 日本エンバイロケミカルズ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100080791

【弁理士】

【氏名又は名称】 高島 一

【電話番号】 06-6227-1156

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006965

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 可塑剤に対する結合能を有する蛋白質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下 (a) 又は (b) の蛋白質又はその塩：

(a) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列、若しくはこれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号 4 で表わされるアミノ酸配列、若しくはこれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質。

【請求項 2】 以下 (a 1) ～ (a 2)、(b 1) ～ (b 2) のいずれかの蛋白質又はその塩：

(a 1) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 4 で表されるアミノ酸配列と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質；

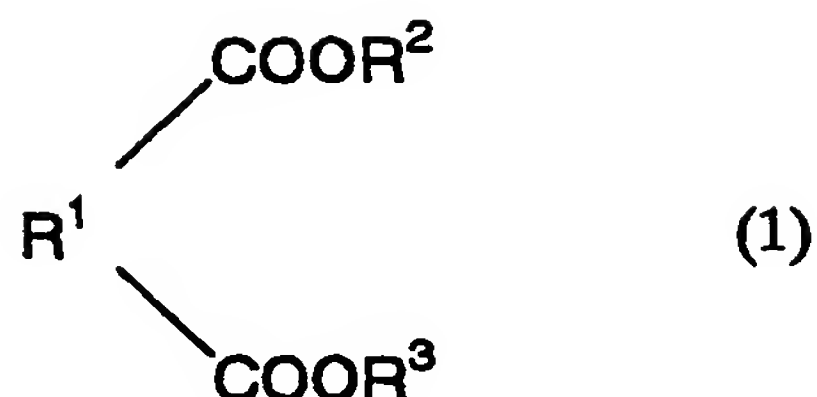
(a 2) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質；

(b 1) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質；

(b 2) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質。

【請求項 3】 可塑剤が、式 (1)：

【化 1】



〔式中、 R^1 は o -フェニレン、 R^2 及び R^3 は同一又は異なって、各々、 H 、炭素数 1 ～ 2 0 の直鎖又は分枝鎖アルキル、置換されていてもよいベンジル又は置換されていてもよいシクロヘキシルを意味する〕で表される可塑剤である、請求項 2 記載の蛋白質。

【請求項 4】 請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項記載の蛋白質を遺伝子組換えする方法。

【請求項 5】 請求項 4 記載の方法により得られた蛋白質又はその塩。

【請求項 6】 請求項 1 ～ 3 及び 5 のいずれか 1 項記載の蛋白質の部分ペプチド又はその塩。

【請求項 7】 請求項 1 ～ 3 及び 5 のいずれか 1 項記載の蛋白質又はその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 8】 請求項 7 記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項 9】 請求項 8 記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項 1 0】 請求項 1 ～ 3 及び 5 のいずれか 1 項記載の蛋白質又はその部分ペプチド或いはそれらの塩を産生せしめ、これを採取することを特徴とする、請求項 1 ～ 3 及び 5 のいずれか 1 項記載の蛋白質又はその部分ペプチド或いはそれらの塩の製造法。

【請求項 1 1】 以下 (a) 及び (b) が連結してなる複合体：

(a) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列、若しくはこれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号 4 で表わされるアミノ酸配列、若しくはこれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質。

【請求項 12】 請求項 11 記載の複合体を使用することを特徴とする、該複合体に結合する可塑剤を同定する方法。

【請求項 13】 請求項 11 記載の複合体を使用することを特徴とする、可塑剤の測定又は定量方法。

【請求項 14】 請求項 11 記載の複合体を含む、可塑剤の測定又は定量用キット。

【請求項 15】 請求項 11 記載の複合体を使用することを特徴とする、可塑剤の濃縮方法。

【請求項 16】 請求項 11 記載の複合体を含む、可塑剤の濃縮用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗可塑剤抗体、該抗体の遺伝子、該可塑剤に対する結合能を有する蛋白質の製造法、可塑剤の測定又は定量方法、可塑剤の濃縮方法等に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、環境中、例えば河川水又は下水中に存在する可塑剤等の環境汚染物質による環境汚染が問題となっている。従って環境中の環境汚染物質やその分解物を測定、分析して、その結果を環境保全に役立たせることが必要となる。このような測定、分析法として、幾つかの優れた方法が知られている（例えば、特許文献 1 及び特許文献 2 を参照）。

【0003】

【特許文献 1】

国際公開第 WO 99/43799 号パンフレット

【特許文献 2】

特開 2001-41958 号公報

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、可塑剤に対する抗体の遺伝子を取得し、元の抗体が持つ抗原に対す

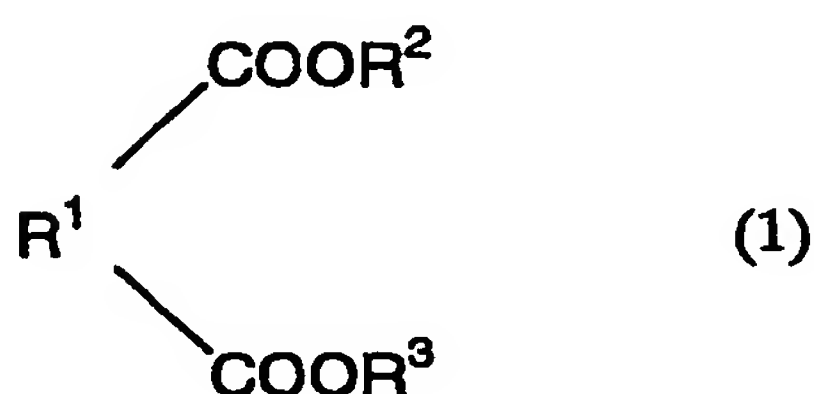
る親和性、抗原結合能、交叉反応性、抗原抗体反応妨害物質耐性、酵素発色反応妨害物質耐性、溶媒耐性等の種々の性質を遺伝子操作の改変技術により作出することにより得られた改変蛋白質に、可塑剤の測定・定量や濃縮に際し、感度の良い、交叉反応性の少ない、妨害物質の影響を受けにくい、溶媒による影響を受けにくい等の有用な性質を付加した可塑剤に対する結合能を有する蛋白質を作製し利用しようとするものである。

【0005】

ここに、可塑剤としては、例えば、
式(1)：

【0006】

【化2】



【0007】

[式中、 R^1 は o -フェニレン又はテトラメチレン、 R^2 及び R^3 は同一又は異なって、各々、 H 、炭素数1～20の直鎖又は分岐鎖(含 sec 、 tert 、 iso)のアルキル、置換されていてもよいベンジル又は置換されていてもよいシクロヘキシルを意味する。]で表される可塑剤(PP) [例、BBP(フタル酸ブチルベンジル)、DBP(フタル酸ジブチル)、DCHP(フタル酸ジシクロヘキシル)、DEP(フタル酸ジエチル)、DEHP(フタル酸ジ(2-エチルヘキシル))、DEHA(アジピン酸ジエチルヘキシル)、DHP(フタル酸ジヘキシル)、DPP(フタル酸ジ n -ペンチル)、DPpP(フタル酸ジプロピル)、DMP(フタル酸ジメチル)、DnOP(フタル酸ジノルマルオクチル)、DINP(フタル酸ジイソノニル)、DNP(フタル酸ジノニル)、DIDP(フタル酸ジイソデシル)、DOA(アジピン酸ジオクチル)、DINA(アジピン酸ジイソノニル)など]が挙げられる。

【0008】

「炭素数 1～20 の直鎖又は分岐鎖のアルキル」としては、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、1-エチルプロピル、ヘキシル、イソヘキシル、1, 1-ジメチルブチル、2, 2-ジメチルブチル、3, 3-ジメチルブチル、2-エチルブチル、ヘプチル、オクチル、2-エチルヘキシル、ノニル、イソノニル、デシル、イソデシルなどが挙げられる。上記「炭素数 1～20 の直鎖又は分岐鎖のアルキル」の「直鎖又は分岐鎖のアルキル」としては、なかでも炭素数 1～12 のアルキルが好ましく、炭素数 6～10 のアルキルがより好ましい。

【0009】

別の局面では、「炭素数 1～20 の直鎖又は分岐鎖のアルキル」は、炭素数 1～20 の置換されていてもよいアルキルでありうる。上記「炭素数 1～20 の置換されていてもよいアルキル」の「アルキル」としては、例えば、上記「炭素数 1～20 の直鎖又は分岐鎖のアルキル」の「アルキル」と同様のものが挙げられるが、なかでも炭素数 1～12 のアルキルが好ましく、炭素数 4～8 のアルキルがより好ましい。

【0010】

「炭素数 1～20 の置換されていてもよいアルキル」、「置換されていてもよいシクロヘキシル」及び「置換されていてもよいベンジル」の置換基としては、例えば、炭素数 1～8 のアルキル（例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、1-エチルプロピル、ヘキシル、イソヘキシル、1, 1-ジメチルブチル、2, 2-ジメチルブチル、3, 3-ジメチルブチル、2-エチルブチルなど）、炭素数 2～8 のアルケニル（例えば、エテニル、1-プロペニル、2-プロペニル、1-メチルエテニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、1-メチル-1-プロペニル、1-メチル-2-プロペニル、2-メチル-1-プロペニルなど）、炭素数 2～8 のアルキニル（例えば、エチニル、1-プロピニル、2-プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、3-ブチニル、1-メチル-2-プロピニルなど）などが挙げられる。

【0011】

上記「炭素数1～8のアルキル」としては、なかでも炭素数1～6のアルキルが好ましく、炭素数1～4のアルキルがより好ましい。上記「炭素数2～8のアルケニル」としては、なかでも炭素数2～6のアルケニルが好ましく、炭素数2～4のアルケニルがより好ましい。上記「炭素数2～8のアルキケニル」としては、なかでも炭素数2～6のアルキニルが好ましく、炭素数2～4のアルキニルがより好ましい。なお、「炭素数1～20の置換されていてもよいアルキル」、「置換されていてもよいシクロヘキシル」、「置換されていてもよいベンジル」の置換基の数は、特に制限されないが、例えば1～3個、好ましくは1～2個、より好ましくは1個でありうる。

【0012】

また、可塑剤の他の例として、DOZ（アゼライン酸ジオクチル）、ESBO（エポキシ化大豆油）、TOTM（トリメット酸トリオクチル）、DBS（セバシン酸ジブチル）、DOS（セバシン酸ジオクチル）、TCP（リン酸トリクレシル）、ATBC（アセチルクエン酸トリブチル）なども挙げることができる。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、親和性を向上させることにより感度良く測定可能等の有用な性質を付加した、抗可塑剤に対する結合能を有する蛋白質の取得につき鋭意検討したところ、その遺伝子もしくは改変遺伝子を含有する形質転換体を作製し、可塑剤に対する結合能を有する蛋白質を効率よく産生させることができることを見出し、さらに研究した結果、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、

(1) 以下(a)又は(b)の蛋白質又はその塩:

(a) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列、若しくはこれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質;

(b) 配列番号4で表わされるアミノ酸配列、若しくはこれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質、

(2) 以下(a1)～(a2)、(b1)～(b2)のいずれかの蛋白質又はそ

の塩:

(a 1) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 4 で表されるアミノ酸配列と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質;

(a 2) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質;

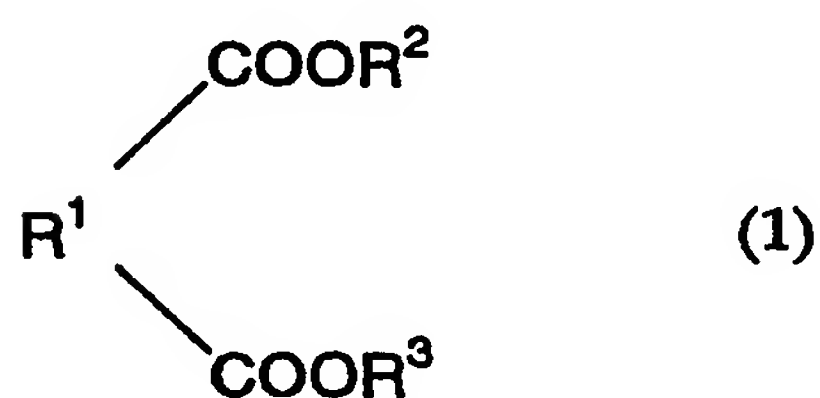
(b 1) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質;

(b 2) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質、

(3) 可塑剤が、式 (1) :

【0014】

【化3】



【0015】

[式中、 R^1 は o -フェニレン、 R^2 及び R^3 は同一又は異なって、各々、H、炭素数1~20の直鎖又は分枝鎖(含sec-, tert-, iso-)アルキル、置換されていてもよいベンジル又は置換されていてもよいシクロヘキシルを意

味する。] で表される可塑剤である、上記 (2) の蛋白質、

(4) 上記 (1) ~ (3) のいずれかの蛋白質を遺伝子組換えする方法、

(5) 上記 (4) の方法により得られた蛋白質又はその塩、

(6) 上記 (1) ~ (3) 及び (5) のいずれかの蛋白質の部分ペプチド又はその塩、

(7) 上記 (1) ~ (3) 及び (5) のいずれかの蛋白質又はその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(8) 上記 (7) のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

(9) 上記 (8) の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(10) 上記 (1) ~ (3) 及び (5) のいずれかの蛋白質又はその部分ペプチド或いはそれらの塩を産生せしめ、これを採取することを特徴とする、上記 (1) ~ (3) 及び (5) のいずれかの蛋白質又はその部分ペプチド或いはそれらの塩の製造法、

(11) 以下 (a) 及び (b) が連結してなる複合体:

(a) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列、若しくはこれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質;

(b) 配列番号 4 で表わされるアミノ酸配列、若しくはこれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質、

(12) 上記 (11) の複合体を使用することを特徴とする、該複合体に結合する可塑剤を同定する方法、

(13) 上記 (11) の複合体を使用することを特徴とする、可塑剤の測定又は定量方法、

(14) 上記 (11) の複合体を含む、可塑剤の測定又は定量用キット、

(15) 上記 (11) の複合体を使用することを特徴とする、可塑剤の濃縮方法、

(16) 上記 (11) の複合体を含む、可塑剤の濃縮用キット、
などである。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明は、配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列、配列番号 4 で表わされるアミノ酸配列、若しくはこれらと実質的に同一のアミノ酸配列を有する（又は、からなる）蛋白質を提供する。

【0017】

一実施態様では、配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質は、上記（a 1）及び（a 2）の蛋白質、並びに、（a 3）配列番号：2 で表されるアミノ酸配列のうち、1 以上の特定領域に相当するアミノ酸配列が、可塑剤に対する他の抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列に含まれる同じ種類の 1 以上の特定領域に相当するアミノ酸配列と交換されているアミノ酸配列を有する（又は、からなる）蛋白質、或いはこのアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する（又は、からなる）蛋白質でありうる。（a 3）の蛋白質のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質としては、例えば、（a 3）の蛋白質のアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ（b）の蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質が挙げられる。

【0018】

上記（a 3）における特定領域としては、相補性決定領域 1、相補性決定領域 2、相補性決定領域 3（以下、必要に応じて CDR 1、CDR 2、CDR 3 と省略）、フレームワーク領域 1、フレームワーク領域 2、フレームワーク領域 3、フレームワーク領域 4（以下、必要に応じて FR 1、FR 2、FR 3、FR 4 と省略）が挙げられる。上記（a 3）では、交換の対象となるアミノ酸配列は、好ましくは、同じ種類の特定領域のアミノ酸配列である。また、交換される特定領域の数は、1 以上であれば特に限定されないが、例えば 1～3 個、好ましくは 1～2 個、より好ましくは 1 個である。アミノ酸配列の交換は、自体公知の方法によって行なうことができる。具体的には、各領域の N、C 両末端に対応するプライマーに対し交換する領域に対応した部分を繋いだようなプライマーを設計し、このプライマーを用いて断片を PCR にて増幅した後、改めて交換した組合せで PCR を行なえばよい。

【0019】

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において CDR 1、CDR 2、CDR 3、FR 1、FR 2、FR 3、FR 4 に相当する領域は、具体的には、以下の通りである：

CDR 1（配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における 31 番目から 35 番目までのアミノ酸残基）；

CDR 2（配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における 50 番目から 66 番目までのアミノ酸残基）；

CDR 3（配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における 99 番目から 110 番目までのアミノ酸残基）；

FR 1（配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における 1 番目から 30 番目までのアミノ酸残基）；

FR 2（配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における 36 番目から 49 番目までのアミノ酸残基）；

FR 3（配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における 67 番目から 98 番目までのアミノ酸残基）；

FR 4（配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における 111 番目から 121 番目までのアミノ酸残基）。

【0020】

また、別の実施態様では、上記（a）の蛋白質は、例えば、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列若しくは上記（a3）の蛋白質のアミノ酸配列に対して有意な相同性を有するアミノ酸配列を有し、かつ（b）の蛋白質のアミノ酸配列に対して有意な相同性を有するアミノ酸配列を有する蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質でありうる。

【0021】

一実施態様では、配列番号 4 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質は、上記（b1）及び（b2）の蛋白質、並びに、（b3）配列番号 4 で表されるアミノ酸配列のうち、1 以上の特定領域に相当するアミノ酸配列が、可塑剤に対する他の抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列に含まれる同じ種類の 1 以上の特定領域に相当するアミノ酸配列と交換されているアミノ

酸配列を有する（又は、からなる）蛋白質、或いはこのアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する（又は、からなる）蛋白質でありうる。（b3）の蛋白質のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質としては、例えば、（b3）の蛋白質のアミノ酸配列において1若しくは2個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ（a）の蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質が挙げられる。

【0022】

上記（b3）における特定領域としては、CDR1、CDR2、CDR3、FR1、FR2、FR3、FR4が挙げられる。上記（b3）では、交換の対象となるアミノ酸配列は、好ましくは、同じ種類の特定領域のアミノ酸配列である。また、交換される特定領域の数は、1以上であれば特に限定されないが、例えば1～3個、好ましくは1～2個、より好ましくは1個である。アミノ酸配列の交換は、自体公知の方法によって行なうことができる。具体的には、各領域のN、C両末端に対応するプライマーに対し交換する領域に対応した部分を繋いだようなプライマーを設計し、このプライマーを用いて断片をPCRにて増幅した後、改めて交換した組合せでPCRを行なえばよい。

【0023】

配列番号4で表されるアミノ酸配列においてCDR1、CDR2、CDR3、FR1、FR2、FR3、FR4に相当する領域は、具体的には、以下の通りである：

CDR1（配列番号4で表されるアミノ酸配列における24番目から34番目までのアミノ酸残基）；

CDR2（配列番号4で表されるアミノ酸配列における50番目から56番目までのアミノ酸残基）；

CDR3（配列番号4で表されるアミノ酸配列における89番目から96番目までのアミノ酸残基）；

FR1（配列番号4で表されるアミノ酸配列における1番目から23番目までのアミノ酸残基）；

FR2（配列番号4で表されるアミノ酸配列における35番目から49番目ま

でのアミノ酸残基) ;

FR3 (配列番号4で表されるアミノ酸配列における57番目から88番目までのアミノ酸残基) ;

FR4 (配列番号4で表されるアミノ酸配列における97番目から106番目までのアミノ酸残基) 。

【0024】

また、別の実施態様では、上記(b)の蛋白質は、例えば、配列番号4で表されるアミノ酸配列若しくは上記(b3)の蛋白質のアミノ酸配列に対して有意な相同性を有するアミノ酸配列を有し、かつ(a)の蛋白質のアミノ酸配列に対して有意な相同性を有するアミノ酸配列を有する蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質でありうる。

【0025】

本発明において、任意の配列番号Xで表されるアミノ酸配列において欠失、置換若しくは付加されるアミノ酸の数としては、1若しくは2個以上であれば特に限定されないが、例えば1~80個、好ましくは1~20個程度、より好ましくは1~9個程度、さらにより好ましくは1~5個、最も好ましくは数個(1又は2個)でありうる。

【0026】

本発明において、アミノ酸の置換としては、特定のアミノ酸が他の任意のアミノ酸で置換される限り特に限定されないが、例えば、保存的アミノ酸置換、非保存的アミノ酸置換であってもよい。「保存的アミノ酸置換」とは、特定のアミノ酸を、そのアミノ酸の側鎖と同様の性質の側鎖を有するアミノ酸で置換することをいう。具体的には、保存的アミノ酸置換では、特定のアミノ酸は、そのアミノ酸と同じグループに属する他のアミノ酸により置換される。一方、「非保存的アミノ酸置換」とは、特定のアミノ酸を、そのアミノ酸の側鎖と異なる性質の側鎖を有するアミノ酸で置換することをいう。具体的には、非保存的アミノ酸置換では、特定のアミノ酸は、そのアミノ酸と異なるグループに属する他のアミノ酸により置換される。同様の性質の側鎖を有するアミノ酸のグループは、当該分野で公知である。例えば、このようなアミノ酸のグループとしては、塩基性(即ち、

正に荷電している) 側鎖を有するアミノ酸 (例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性 (即ち、負に荷電している) 側鎖を有するアミノ酸 (例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、中性 (即ち、荷電していない) 側鎖を有するアミノ酸 (例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン) が挙げられる。また、中性側鎖を有するアミノ酸は、さらに、極性側鎖を有するアミノ酸 (例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、及び非極性側鎖を有するアミノ酸 (例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン) に分類することもできる。また、他のグループとして、例えば、芳香族側鎖を有するアミノ酸 (例えば、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)、水酸基 (アルコール性水酸基、フェノール性水酸基) を含む側鎖を有するアミノ酸 (例えば、セリン、トレオニン、チロシン) など挙げることができる。

【0027】

また、任意の配列番号 X で表されるアミノ酸配列に対して有意な相同性を有するアミノ酸配列としては、任意の配列番号 X で表されるアミノ酸配列に対して、例えば約 40% 以上、好ましくは約 60% 以上、より好ましくは約 80% 以上、さらにより好ましくは約 90% 以上、最も好ましくは約 95% 以上の相同性を有するアミノ酸配列が挙げられる。

【0028】

相同性の程度 (%) は、自体公知の方法によって決定することができる。例えば、相同性の程度 (%) は、Smith 及び Waterman のアルゴリズム (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489) を採用している Gap プログラム (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix (登録商標), Genetics Computer Group, University Research Park, Madison WI) を初期設定で使用するによって決定することができる。また、Karlin 及び Altschul のアルゴリズム (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87:2264-2268, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90:5873-5877) を採用している BLAST プログラムを用いてもよい。例えば、蛋白質

の相同性を比較する場合、XBLASTプログラムを初期設定で使用するによって、相同性の程度(%)を決定することができる。さらに、Myers及びMiller (CABIOS, 1988, 4:11-17)のアルゴリズムを採用しているALIGNプログラム(version 2.0) (GCG sequence alignment software packageの一部)を用いてもよい。ALIGNプログラムを用いてアミノ酸配列を比較する際の設定としては、例えば、PAM120 weight residue table, gap length penalty = 12, gap penalty = 4 が挙げられる。また、塩基配列の相同性の程度(%)を決定する場合にも同様に、これらのプログラムを用いることができる。

【0029】

「複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する」とは、複合体が可塑剤に対して反応性を有することを意味する。可塑剤としては、例えば、上述したものが挙げられる。複合体が可塑剤に対して結合能を有するか否かは、自体公知の方法若しくはそれに準じる方法によって決定することができる。なお、本発明の複合体は、上記可塑剤のいずれかに対する結合能を有すればよい。

【0030】

配列番号2で表されるアミノ酸配列、配列番号4で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質、並びに(a3)、(b3)の蛋白質に1以上のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を導入することにより、可塑剤に対する結合能や交叉反応性が変化した蛋白質を得ることができる。1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加される領域は、CDR1、CDR2、CDR3、FR1、FR2、FR3、FR4からなる群より選択される任意の1以上の領域でありうる。

【0031】

本発明の部分ペプチドとしては、上記(a)又は(b)の蛋白質の一部を構成するペプチドであれば特に限定されないが、例えば、上記(a)又は上記(b)の蛋白質のアミノ酸配列において、少なくとも6個以上、好ましくは少なくとも8個以上、より好ましくは少なくとも10個以上、さらにより好ましくは少なくとも12個以上、最も好ましくは少なくとも15個以上の連続するアミノ酸からなるペプチドが用いられる。また、本発明の部分ペプチドとして、上記(a)の蛋白質、又は上記(b)の蛋白質のCDR1、CDR2、CDR3、FR1、F

R 2、F R 3、F R 4 に相当するアミノ酸配列を有する（又は、からなる）部分ペプチドを用いることもできる。

【0032】

本発明のタンパク質又はその部分ペプチドの塩としては、自体公知の塩、例えば、酸付加塩などを用いることができる。酸付加塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0033】

本発明において「複合体」とは、上記（a）の蛋白質と上記（b）の蛋白質とが連結している限り特に限定されないが、例えば、上記（a）の蛋白質と上記（b）の蛋白質とがリンカーを介して又は介さずに共有結合している複合体が挙げられる。また、複合体は、上記蛋白質、部分ペプチドと同様に塩の形態（好ましくは、酸付加塩）で用いることもできる。

【0034】

上記（a）の蛋白質と上記（b）の蛋白質とを融合させるために用いられるリンカーとしては、当該分野で公知のものを用いることができ特に限定されないが、例えば、GGGS（配列番号5）の繰り返し配列、GSTSGSGKSSEGKG（配列番号6）、GSTSGSGKSSEGSSTKG（配列番号7）、GSTSGKPSEGKG（配列番号8）、GSTSGSGKPGSGEGSTKG（配列番号9）等のペプチドなどをリンカーとして用いることができる（例えば、Production of single-chain Fv monomers and multimers, D. Filpula, J. McGuire, and M. Whitlow. In "Antibody Engineering" Edited by J. McCafferty, H. R. Hoogenboon, and D. J. Chiswell. p.253-268, IRL PRESS (1996)参照）。上記（a）の蛋白質と上記（b）の蛋白質とがリンカーを介して又は介さずに共有結合している複合体は、例えば、上記（a）の蛋白質と上記（b）の蛋白質を別々に調製した後、これら蛋白質をそれぞれリンカーに共有結合させることにより、又はリンカーを介さずに直接共有結合させることによって得ることができる。しかし、この方法では複合体を得るために、上記（a）の蛋

白質及び上記（b）の蛋白質の調製後にさらに両者を連結する工程を必要とするため煩雑である。また、共有結合部位が異なるものが複数得られるおそれがあり、再現性等の観点から好ましい単一な複合体を調製しにくいという問題もある。従って、本発明の複合体としては、例えば、上記（a）の蛋白質及び上記（b）の蛋白質がペプチドリンカーを介してアミド結合することにより又は直接アミド結合することにより融合している単鎖抗体が好ましい。単鎖抗体は、上記（a）の蛋白質をコードする塩基配列と、ペプチドリンカーをコードする塩基配列と（リンカーを介してアミド結合している単鎖抗体を得る場合）、上記（b）の蛋白質をコードする塩基配列とを読み枠を合わせて含む発現ベクターを含有する形質転換体から容易に調製できるため有用である。なお、ペプチドリンカーをコードする塩基配列は、上記（a）及び（b）の蛋白質をコードする塩基配列と読み枠を合わせたときに終止コドンを含まないものであれば特に限定されない。

【0035】

ペプチドリンカーは、当該分野で公知の方法により適宜選択することができる。具体的には、ペプチドリンカーとしては、1個以上のアミノ酸残基からなる任意の長さのペプチドを用いることができるが、例えば10個以上のアミノ酸残基からなるペプチドが用いられる。

【0036】

本発明はまた、本発明の蛋白質のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明のポリヌクレオチドは、前述した本発明の蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであれば如何なるものであってもよい。

【0037】

具体的には、本発明のポリヌクレオチドとしては、上記（a）の蛋白質をコードする塩基配列（例えば、配列番号1で表される塩基配列）、上記（b）の蛋白質をコードする塩基配列（例えば、配列番号3で表される塩基配列）、上記単鎖抗体をコードする塩基配列が挙げられる。また、本発明のポリヌクレオチドとして、本発明の蛋白質を遺伝子組換えして得られた蛋白質をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを挙げることできる。

【0038】

上述した本発明のポリヌクレオチドは、本明細書の開示に基づき公知の方法を用いて得ることができる。例えば、限定されるわけではないが、本発明のポリヌクレオチドは、抗可塑剤モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマより得ることができる。抗体蛋白のN末端アミノ酸配列を決定し、ついで、このアミノ酸配列より推定した塩基配列を持つプライマーを作成し、抗体産生ハイブリドーマより公知の方法により mRNA を調製し、それを基に逆転写酵素により一本鎖 cDNA を合成後、本明細書に開示された抗可塑剤モノクローナル抗体の重鎖又は軽鎖の可変領域のアミノ酸配列又は塩基配列に基づき、PCR 法、ハイブリダイゼーション法等を用いることによって、本発明のポリヌクレオチドを選択的に得ることが可能である。このような方法は周知であり、当業者は本明細書の開示に基づいて、本発明のポリヌクレオチドを容易に単離することが可能である。これらの方法の具体的操作方法としては、例えば、たとえば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 3rd edition (J.Sambrook et.al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001) に記載の方法などが挙げられる。また、mRNA の抽出はアマシャム社の QuickPrep mRNA 精製キットの操作説明書に記載の方法で、cDNA の合成や 5'-RACE 法はクロンテック社の SMART RACE キットの操作説明書に記載の方法なども挙げられる。

【0039】

一実施態様では、本発明の複合体は組換え抗体（その断片をも含む）であり得る。組換え抗体 (Recombinant Antibodies) の作製方法などについては、RECOMBINANT ANTIBODIES (ed.by F.Breitling, John Wiley & Sons(USA), 1999) の第2章に、組換え抗体断片 (Recombinant Antibody Fragments) の作製方法、ハイブリドーマ細胞 (Hybridoma Cell Line) からの抗体遺伝子のクローニング (Cloning) 方法、抗体遺伝子ライブラリー (Antibody Gene Libraries) の作製方法、遺伝子ライブラリーからの組換え抗体の選択 (Selection of Recombinant Antibodies From Gene Libraries) 方法、抗体の遺伝子操作 (Antibody Engineering) 方法などが記載されており、これらの方法により組換え抗体の作製が可能である。

【0040】

また、同書第4章には、組換え抗体の製造方法も記載されており in vitro ではウサギ Reticulocyte lysate での発現が、原核生物 (Prokaryote) では、大腸菌 (E.coli) の Cytoplasm、periplasm の soluble fraction、periplasm の inclusion body や、Bacillus、Streptomyces での発現が、真核生物 (Eukaryote) では、Pichia、Saccharomyces、Schizosaccharomyces 等の酵母、Trichoderma などのカビ、昆虫細胞では Baculovirus、myeloma、CHO、COS 等の動物細胞、タバコなどの transgenic 植物、transgenic 動物などでの発現方法が記載されており、これらにより形質転換体の作製が可能である。

【 0 0 4 1 】

さらに、同書第4章には、組換え抗体の精製方法も記載されており、まず、物理的な方法、例えば、組換え生物の遠心分離による集菌、超音波などによる細胞破碎、機械的な磨砕や酵素的な溶菌で目的物を分離する。次にイオン交換クロマトグラフィー、size exclusion chromatography、thiophilic adsorption chromatography、affinity chromatographyなどを組み合わせて精製する。特に affinity chromatography は効率的な方法であり、抗原認識特異性を活用した antigen-specific methods や、protein A や protein G などの Fc 部位や Fab' 部位への結合を利用した antibody-specific method や、そのような部位を持たない scFv の場合に tag と言われる小さなペプチド断片を持った融合抗体として発現させ、この tag に特異的な affinity カラムを使用する方法 (例 His-tag、c-myc tag、Strep tag など) などにより精製することにより製造することが可能である。

【 0 0 4 2 】

まず、抗可塑剤モノクローナル抗体産生細胞の cDNA ライブラリーを構築し、保存性の高い免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の定常領域や可変領域の N 末端配列等をコードする cDNA をプローブに用いて、当該 cDNA ライブラリーをスクリーニングして抗可塑剤モノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖の cDNA の単離を行うことができる。これらの方法の具体的操作方法としては、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 3rd edition (J.Sambrook et.al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001) に記載の方法などが挙げられる。

本発明のポリヌクレオチドは、また、本明細書の記載の配列に基づき、周知の

技術を用いて化学的に合成してもよい。

【0043】

本発明の蛋白質を遺伝子組換えする方法としては、自体公知の方法が挙げられ、例えば、その蛋白質をコードする塩基配列を変換する方法を用いることができる。ポリヌクレオチド（例えば、DNA）の塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、MutanTM-Super Express Km（宝酒造（株））、MutanTM-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LAPCR法やGapped duplex法やKunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行うことができる。クローン化された抗体蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、又は所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGA又はTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。本発明の抗体蛋白質の発現ベクターは、例えば、（イ）本発明の抗体蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、（ロ）該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

【0044】

組換え抗体（Recombinant Antibody）の作製方法

組換え抗体としては、種々の形態のものが作製できるが、Roland KontermannのANTIBODY ENGINEERING HOME PAGE (<http://aximtl.imt.uni-marburg.de/~rek/AEP.html>、2002年2月25日)に記載のものはその例であり、例えば、Fab' fragments、F(ab') fragments、Fv fragments (Fv)、single-chain Fv fragments (scFv)、bispecific-chimeric scFV (χ -scFv)、tandem scFV (scFv)₂、bispecific-(scFv)₂、disulfide-linked scFv、disulfide-stabilized Fv fragments(dsFv)、diabody、single-chain diabody (scDb)、bivalent diabody、bispecific diabody、knob-into-hole stabilized diabody、disulfide-stabilized diabody、triabody、tetraabody、trisppecific triabody、CL-dimerized scFv、CH1-CL-dimerized scFv、CH3-dimerized scFv、knob-into-hole CH3-dimerized scFv、CH3-dim

erized bivalent diabody、Fc-dimerized scFv、Fab-scFv fusions、Ig-scFv fusions、leucine-zipper stabilized scFv dimers、helix-stabilized scFv dimers、4 helix-bundle stabilized scFv tetramers、streptavidin-scFv、intrabodyなどが組換え抗体として作製可能である。

また、変異処理を施した抗体遺伝子のシャッフリング(Shuffling)により、目的の有用な性質を有する抗体を選択する方法も本発明の範囲内に入る。

【 0 0 4 5 】

組換え抗体の発現系

組換え抗体の発現系としては、効率よく組換え抗体を発現できる系であればどのような発現系でもよいが、Roland KontermannのANTIBODY ENGINEERING HOME PAGE (<http://aximtl.imt.uni-marburg.de/~rek/AEP.html>、2002年2月25日)に纏められているように、例えば、mammalian cells では、Fv、scFvやscFv derivatives、bivalent及びbispecific scFv、scFv又はFab-fusion proteins、intrabodiesなどの発現が、Insect cellsでは、scFvやFabなどの発現が、Fungal cellsでは、Fv、scFvやFabなどの発現が、Plants cellsでは、scFvの発現が知られており、このように種々の発現系が使用可能である。

【 0 0 4 6 】

c DNAライブラリーの作製法

c DNAライブラリーの作製法としては、効率よく c DNAライブラリーを作製できる方法であればどのような方法でもよいが、Roland KontermannのANTIBODY ENGINEERING HOME PAGE (<http://aximtl.imt.uni-marburg.de/~rek/AEP.html>、2002年2月25日)に述べられているファージディスプレイ法も、その一つである。

【 0 0 4 7 】

組換え抗体の選択方法

作製したライブラリーから、目的の組換え抗体を選択する方法としては、Roland KontermannのANTIBODY ENGINEERING HOME PAGE (<http://aximtl.imt.uni-marburg.de/~rek/AEP.html>、2002年2月25日)に記載のプロトコル、「ファージミドライブラリーからの組換え抗体の単離法」や、「fdファージライブラリーから

のペプチドの単離法」などの方法も、選択方法として使用可能である。

【0048】

ポリヌクレオチド（例えば、DNA）は、目的によりそのまま、又は、所望により切断、又は他のポリヌクレオチドの付加などとして使用することができる。例えば、DNAは、その末端に翻訳開始コドンATGを有していてもよい。このような改変は、自体公知の方法により、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 3rd edition (J.Sambrook et. al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001)に記載の方法等により行なうことができる。

【0049】

このようにして得られたDNAを、プロモーター、翻訳開始コドン、適当なシグナル配列等を自体公知の方法でベクターに組込むことにより、組換えベクターを製造することができる。該ベクターやプロモーターや宿主菌株としては、たとえば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 第3版 (J.Sambrook et .al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001)のAppendix3に記載のベクター、プロモーターやエシェリヒア属菌株等が挙げられる。

【0050】

ベクターとしては、上記以外に、大腸菌由来のプラスミド（pET-276, pCANTAB-5E, pUC19, pT7Blue T.）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110、pTP5、pC194）、酵母由来のプラスミド（例、pSH19, pSH15）、λファージ、M13K07などのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

【0051】

プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでも良い。例えば、宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λP_Lプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、

宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が動物細胞である場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなど、宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

【0052】

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製起点などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、アンピシリン耐性遺伝子（以下Amp^Rと略称する場合がある）、カナマイシン耐性遺伝子（以下Km^Rと略称する場合がある）、クロラムフェニコール耐性遺伝子（以下Cm^Rと略称する場合がある）等が挙げられる。

【0053】

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明の抗体蛋白質のN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、phoA・シグナル配列、ompA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。このようにして構築された本発明の抗体蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

【0054】

宿主としては、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌としては、例えばエシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、60巻、160 (1968)]、JM103 [ヌクレイック・アシッズ・リサーチ、(nucleic Acids Research)、9巻、309 (198

1)], J A 2 2 1 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120 巻, 517 (1978)), H B 1 0 1 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41 巻, 459 (1969)], C 6 0 0 [ジェネティクス (Genetics), 39 巻, 440 (1954)], B L 2 1 D E 3 (p L y s S), T G - 1, J M 1 0 9 などが用いられる。バチルス属菌としては、例えば、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) M I 1 1 4 [ジーン (Gene), 24 巻, 255 (1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95 巻, 87 (1984)] などが用いられる。酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) A H 2 2, A H 2 2 R -, N A 8 7 - 1 1 A, D K D - 5 D, 20B-12, シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) N C Y C 1 9 1 3, N C Y C 2 0 3 6、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。昆虫細胞としては、例えば、ウイルスが A c N P V の場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; S f 細胞)、*Trichoplusia ni* の中腸由来の M G 1 細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来の High FiveTM 細胞、*Mamestrabracassicae* 由来の細胞又は *Estigmena acrea* 由来の細胞などが用いられる。ウイルスが B m N P V の場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; B m N 細胞) などが用いられる。該 S f 細胞としては、例えば、S f 9 細胞 (ATCC CRL1711)、S f 2 1 細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ビボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら, ネイチャー (Nature), 315 巻, 592 (1985)]。動物細胞としては、例えば、サル細胞 C O S - 7, V e r o, チャイニーズハムスター細胞 C H O, マウス L 細胞、マウス A t T - 2 0、マウスミエローマ細胞、ラット G H 3、ヒト F L 細胞などが用いられる。

【0055】

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69 巻, 2110 (1972) やジーン (Gene), 17 巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行うことができる。バチ

ルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻、111 (1979) などに記載の方法に従って行うことができる。酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻、182-187 (1991)、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻、1929 (1978) などに記載の方法に従って行うことができる。昆虫細胞又は昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 6巻、47-55 (1988) などに記載の方法に従って行うことができる。動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコル、263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻、456 (1973) に記載の方法に従って行うことができる。このようにして、抗体蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

【0056】

さらに、このようにして得られた形質転換体を培養することにより、本発明の蛋白質を生成せしめ、これを採取することにより本発明の蛋白質を製造することができる。

培養に用いられる培地としては、宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培地に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機又は有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、成長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

【0057】

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1972)] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、 3β -インドリルアクリル酸やイソプロピルチオガラクトシド (IPTG) のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約 $15 \sim 43^{\circ}\text{C}$ で約 $3 \sim 24$ 時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約 $30 \sim 40^{\circ}\text{C}$ で約 $6 \sim 24$ 時間行い、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K.L. ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)] や、 0.5% カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G.A. ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培地のpHは約 $5 \sim 8$ に調整するのが好ましい。培養は通常約 $20 \sim 35^{\circ}\text{C}$ で約 $24 \sim 72$ 時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0058】

宿主が昆虫細胞又は昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非働化した 10% ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約 $6.2 \sim 6.4$ に調整するのが好ましい。培養は通常約 27°C で約 $3 \sim 5$ 日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約 $5 \sim 20\%$ の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)] , DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)] , RPMI 1640培地 [ザ・ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル

・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) , 199 卷, 519 (1967)] , 199 培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティー・フォー・ザ・バイオリジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine) , 73 卷, 1 (1950)] などが用いられる。pH は約 6 ~ 8 であるのが好ましい。培養は通常約 30℃ ~ 40℃ で約 15 ~ 60 時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜又は細胞外に本発明の抗体蛋白質を生成せしめることができる。

【0059】

このようにして得られた培養物から、目的とする本発明の抗体蛋白質を分離精製するには、例えば下記の方法により行うことができる。本発明の抗体蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチーム及び／又は凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により抗体蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトン X-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に抗体蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる抗体蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行うことができる。これら公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、及び SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などを用いて分離精製できる。

【0060】

本発明の複合体、蛋白質、部分ペプチド及び／又はそれらの塩は、自体公知の

蛋白質の合成法に従って、あるいは本発明の蛋白質を適当なプロテアーゼで切断することによって製造することができる。蛋白質の合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。即ち、本発明の蛋白質を構成する部分ペプチド若しくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、精製物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的の蛋白質を製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下に記載された方法が挙げられる。

【0061】

- ①M. Bodanszky及びM. A. Ondetti、ペプチドシンセシス(Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- ②Schroeder及びLuebke、ザペプチド(The peptide), Academic Press, New York (1965年)
- ③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株)(1975年)
- ④矢島治明及び榊原俊平、生化学実験講座1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)
- ⑤矢島治明監修、続医薬品の開発第14巻ペプチド合成広川書店

また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の蛋白質を精製単離することができる。上記方法で得られる蛋白質が遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0062】

以上のようにして得られた本発明の複合体及び／又は蛋白質は、可塑剤を定量的に測定する際の試薬として使用したり、種々の担体に固定化することにより可塑剤を濃縮するためのアフィニティーカラムの製造などに利用することができる。また、本発明の複合体及び／又は蛋白質に結合(即ち、交叉反応)する可塑剤を同定することにより、本発明の複合体及び／又は蛋白質の適用範囲を拡大することができる。さらに、本発明は、本発明の複合体及び／又は蛋白質を含む、可塑剤の測定又は定量用キット、可塑剤の濃縮用キットを提供する。

【0063】

なお、上記キットでは、1種類の本発明の複合体及び／又は蛋白質のみを含んでいてもよいが、種類の異なる複数の本発明の複合体及び／又は蛋白質を含むことができる。例えば、交叉反応性の異なる複数の複合体を含むキットを使用することによって特定の可塑剤を特異的に測定・定量することができる。

【0064】

本発明の複合体及び／又は蛋白質による可塑剤の測定法としては、放射性同位元素免疫測定法（RIA法）、ELISA法（Engvall, E., Methods in Enzymol., 70, 419-439 (1980)）、蛍光抗体法、プラーク法、スポット法、凝集法、オクタロニー（Ouchterlony）等の一般に抗原の検出に使用されている種々の方法（「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」、株式会社R&Dプランニング発行、第30頁～第53頁、昭和57年3月5日）が挙げられる。感度、簡便性等の観点からELISA法が汎用される。

【0065】

また、本発明の複合体及び／又は蛋白質の固定化用担体としては、例えば、マイクロプレート（例、96ウェルマイクロプレート、24ウェルマイクロプレート、192ウェルマイクロプレート、384ウェルマイクロプレートなど）、試験管（例、ガラス試験管、プラスチック試験管）、ガラス粒子、ポリスチレン粒子、修飾ポリスチレン粒子、ポリビニル粒子、ラテックス（例、ポリスチレン・ラテックス）、ニトロセルロース膜、臭化シアン活性化濾紙、DBM活性化濾紙、粒状固相（例、セファロース、セファデックス、アガロース、セルロース、セファクリルなど）、鉄含有ポリカーボネート膜、マグネット含有ビーズなどが挙げられる。

【0066】

本発明の複合体及び／又は蛋白質を担体に担持させるには、自体公知の方法〔例、上記「エンザイムイムノアッセイ」第268～296頁、「アフィニティークロマトグラフィーハンドブック」（アマシャム ファルマシア バイオテック株式会社（1998年12月20日発行））〕などで担持できる。

【0067】

また、本発明の免疫学的濃縮方法においては、大量の検体を、免疫吸着体カラムを通過させたり、免疫吸着体粒子と混合したりすることにより、抗原抗体反応を利用して、目的の環境ホルモン、その分解物又はそれらの混合物を、免疫吸着体に捕捉させ、ついで、pHの変更（pH 2.5～3に下げる、pH 11.5に上げるなど）、イオン強度の変更（1M NaClなど）、極性の変更（10%ジオキサン、50%エチレングリコール、3Mカオトロピック塩（SCN⁻、CCl₃COO⁻、I⁻）など）、蛋白変性剤（8M尿素、6M塩酸グアニジンなど）の添加や、電気泳動による解離など公知の方法で溶出させることにより、免疫学的に夾雑物の少ない目的物質を、数千から数万倍もの高倍率に濃縮できる。

これにより、環境中に極く微量しか存在しない環境ホルモン、その分解物又はそれらの混合物を、溶媒抽出法や固層抽出法などの従来の濃縮方法と比較して、はるかに高倍率に濃縮することができ、しかも定量を妨害する夾雑物等の含量の少ない濃縮液を得ることができる。

【0068】

本明細書及び図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体がありうる場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸

cDNA : 相補的デオキシリボ核酸

a, A : アデニン

t, T : チミン

g, G : グアニン

c, C : シトシン

i, I : ヒポキサンチン（イノシン）

RNA : リボ核酸

mRNA : メッセンジャーリボ核酸

アミノ酸の略記

3 文字 : 1 文字 : 日本名

G l y : G : グリシン

A l a : A : アラニン

V a l : V : バリン

L e u : L : ロイシン

I l e : I : イソロイシン

S e r : S : セリン

T h r : T : スレオニン

C y s : C : システイン

M e t : M : メチオニン

G l u : E : グルタミン酸

A s p : D : アスパラギン酸

L y s : K : リジン

A r g : R : アルギニン

H i s : H : ヒスチジン

P h e : F : フェニルアラニン

T y r : Y : チロシン

T r p : W : トリプトファン

P r o : P : プロリン

A s n : N : アスパラギン

G l n : Q : グルタミン

A s x : B : A s n + A s p

G l x : Z : G l n + G l u

【0069】

【実施例】

以下に実施例を挙げて、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0070】

【材料】

抗DEHP抗体 (DH-150) 産生ハイブリドーマ

抗DEHP抗体 (DH-150) (アイソタイプ $\gamma 2a$, κ) を産生するハイブリドーマ株、DH-150は、Goda Y. et al.; 「Development of the ELISAs for Detection of Endocrine Disrupters」, Fifth International Symposium on Environmental Biotechnology (ISEB2000), Program/Abstracts, p.119 (2000)に発表した手順により作製した。本細胞は、10%ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地 (ハイブリドーマ用培地) (N. Kobayashi et al., J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 64, 171-177 (1998) 参照) を用いて継代培養した。

プライマー

cDNAの合成及びPCRに用いたプライマーは、クラボウ又はエスベックオリゴサービスに化学合成とカートリッジ精製を依頼した。各プライマーの塩基配列を表1に示す。

【 0 0 7 1 】

【表 1】

表 1. 実施例で用いたプライマー

プライマー名	塩基配列
G2a-CH-1	5' GCTTGCCGGGTGGGCCAC 3' (配列番号 1 0)
G2a-CH-2	5' AACTGCTGGACAGGGAT 3' (配列番号 1 1)
G2a-CH-3-XmaI	5' GGATCCCGGGAGTACCCCTTGACCAGGC 3' (配列番号 1 2)
K-CH-1	5' GTTGAAGCTCTTGACAAT 3' (配列番号 1 3)
K-CH-3-XmaI	5' GGATCCCGGGTGGATGGTGGGAAGATG 3' (配列番号 1 4)
AAP	5' GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG 3' (配列番号 1 5)
AUAP	5' GGCCACGCGTCGACTAGTAC 3' (配列番号 1 6)
MKV-9	5' ACTAGTCGACATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG 3' (配列番号 1 7)
KS-back	5' GGAAACAGCTATGACCATG 3' (配列番号 1 8)
KS-for	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3' (配列番号 1 9)
VH-5	5' ATTGTTATTACTCGCGGCCCAACCGGCCATGGCCGAGGTGCATCTGGT GGAGTCTGGG 3' (配列番号 2 0)
VH-3	5' CCGCCGGATCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTGAGGAGACGATG ACTGAGGTTC 3' (配列番号 2 1)
VL-5	5' CAGGCGGAGGTGGATCCGGCGGTGGCGGATCGGATATCCAGATAACAC AGATTACA 3' (配列番号 2 2)
VL-3	5' GCTCAACTTTCTTGTGCTGACTTTATCATCATCATCTTTATAATCTTTCA GCTCCAGCGTGGTCCCTGC 3' (配列番号 2 3)

【 0 0 7 2 】

[実施例 1：抗DEHP抗体 (DH-150) V_H遺伝子のクローニング]

ハイブリドーマ株DH-150 (1 x 10⁷ 個) から、RNeasy miniキット (QIAGEN) を用いて全RNAを抽出した。本RNA (4.2 μg) に γ 2a鎖特異的プライマー (G2a-CH-1) 又は κ 鎖特異的プライマー (K-CH-1) 及び Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) (1 μL) を添加し、添付の緩衝液中 (25 μL)、42℃で50分間インキュベートした。70℃で15分間インキュベートして酵素を失活させた後、粗反応液をGlassMAX spin cartridge (Invitrogen) を用いて精製し、V_H又はV_L遺伝子を含むfirst strand cDNA (V_H-cDNA及びV_L-cDNA) をそれぞれ得た。ついでV_H-cDNAを鋳型に用いる5'-RACE [5'RACE system for rapid amplificatio

n of cDNA ends, version 2.0 (Invitrogen)] によりV_Hドメインの遺伝子断片を得た。すなわちcDNA溶液 (10 μ L) にデオキシシトシン三リン酸 (dCTP) (5 nmol)、terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT) (1 μ L) を加え、TdT緩衝液 (25 μ L) 中、37℃で10分間反応させた。ついで、ポリC配列と γ 2a鎖定常部に相補的なプライマー (各々AAP、G2a-CH-2) (各20 pmol) 及びEx-Taq DNA polymerase (宝酒造) (1 U) を用いてEx-Taq緩衝液 (40 μ L) 中でPCR [95℃、1分間; 64℃、1分間; 72℃、2分間 (35サイクル)、次いで72℃、10分間] を行った。さらに、本PCR反応液の1000倍希釈液 (10 μ L) を鋳型として、プライマー AUAP及びG2a-CH-3-XmaI (各50 pmol) とEx-Taq DNA polymerase (2.5 U) を用いるnested PCR (液量100 μ L) を同上の反応条件で行った。得られた粗反応液を低融点アガロース (SeaPlaque; BMA) (2%) を用いる電気泳動 (TAE緩衝液; 50 V) に付して、約800 bpのバンドをQIAquick gel extraction kit (Qiagen) を用いて回収し、目的のV_H遺伝子を含むDNA断片 (V_H-DNA) を得た。

【 0 0 7 3 】

[実施例 2 : 抗DEHP抗体 (DH-150) V_L遺伝子のクローニング]

上記のV_L-cDNA (1000倍希釈液10 μ L) を鋳型として、既報のマウス可変部遺伝子クローニング用のプライマー MKV-1・11 (S. T. Jones et al., Biotechnology, 9, 88-89 (1991) 参照) のいずれかとK-CH-3-XmaI (各50 pmol) を組み合わせるPCRを試みた。本PCR [95℃、1分間; 50℃、1分間; 72℃、3分間 (35サイクル)、次いで72℃、10分間] にはPfu DNA polymerase (Promega) (3 U) を用い、Pfu 緩衝液中 (100 μ L) で反応を行った。粗反応液の一部をアガロース電気泳動に付したところ、MKV-9プライマーを用いる時に予想されるサイズ (約400 bp) のバンドが明瞭に観察された。そこで、残りの反応液を上記の方法で精製し、目的のV_L遺伝子を含むDNA断片 (V_L-DNA) を得た。

【 0 0 7 4 】

[実施例 3 : V_H及びV_L遺伝子のサブクローニング]

上述のV_H-DNA及びV_L-DNA (計算値 各1.5 μ g) にそれぞれXma I (40 U) を加え、37℃で一夜インキュベートした。反応液をフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (PCI) 抽出したのちエタノール沈殿を行い、得られた沈殿にSal

I (40 U) を加えて再び37℃で一夜インキュベートした。反応液をPCI抽出/エタノール沈殿に付したのち、上記のように低融点アガロースを用いる電気泳動に付して目的の遺伝子断片を精製した。これらDNA (0.1 μ g) を、同様にXma I/Sal I処理したpBluescript IIベクター (0.25 μ g) と混合し、T4 DNAリガーゼ (New England Biolabs) (1600 U) を加えて16℃で一夜インキュベートした。反応液をPCI抽出/エタノール沈殿に付して精製し、得られる組換えプラスミドをXL1-Blue Subcloning-grade competent cells (Stratagene) にheat shock法によりトランスフォーメーションした。トランスフォーメーション液をアンピシリンを含む2xYT-agarプレートに塗布して37℃で一夜インキュベートした。得られた形質転換体クローン (V_H -DNA、 V_L -DNA各々について4クローンずつ) を任意に選択してアンピシリンを含む2xYT培地 (10 mL) 中で培養し、15%グリセロール混合液としたのち-80℃で保存した。

【 0 0 7 5 】

[実施例 4 : V_H 及び V_L 遺伝子の塩基配列の決定]

上記の形質転換クローンをアンピシリンを含む2xYT培地 (10 mL) 中で培養し、QIAGEN plasmid mini kit (Qiagen) を用いてプラスミドを抽出した。その一部 (0.5又は1.0 μ g) に、シークエンシング用プライマー (KS-back又はKS-for; 各1.8 pmol) を加え、Dual CyDye terminator sequencing kit (Amersham Biosciences) を用いてPCR反応を行った。本PCRでは、95℃、20秒間; 55℃、15秒間; 70℃、60秒間のサイクルを35回繰り返した。反応液をエタノール沈殿に付して増幅したDNAを回収し、本キットに添付された formamide loading dye (4 μ L) に溶解し、Long-Read Tower DNAシークエンサー (Amersham Biosciences) を用いて電気泳動 (6% ポリアクリルアミドゲル; TBE緩衝液; 1500 V; 200分間) を行った。得られた塩基配列データから、 V_H -DNA、 V_L -DNA各々について4クローン間のコンセンサス配列を得た。このようにして得られた塩基配列並びに推定されるアミノ酸配列を図1、2 (各々 V_H 及び V_L) に示す。この結果から、 V_H 及び V_L のサブグループは、Kabatの分類 ([Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition] U.S. Department of Health and Human Service, 1991参照) に基づいて、各々III(D)、V と決定した。また、Kabat のデータベース ([S

equences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition] U.S. Department of Health and Human Service, 1991 参照) との比較から、 V_H 及び V_L における相補性決定領域 (complementarity-determining region; CDR) (抗原と直接相互作用し、親和力や特異性の発現に重要な役割を果たすアミノ酸配列) を特定した (図 1、2)。

【 0 0 7 6 】

[実施例 5 : ScFv遺伝子の構築]

上記の遺伝子塩基配列の結果に基づいて V_H 、 V_L 遺伝子それぞれの5'末端、3'末端に特異的なプライマー (V_H -5、 V_H -3、 V_L -5、 V_L -3) (表 1) を設計し、実施例 1 で得られたfirst strand cDNAを鋳型としてPCRを行った。なお、 V_H -5 プライマーにはNco I認識配列を、 V_H -3プライマーにはSal I認識配列及びFLAG配列を導入した。また、 V_H -3、 V_L -5の両プライマーには、 V_H と V_L を連結するためのリンカー配列 (Gly_4Ser)₃ (配列番号 5) をコードする塩基配列を付加した。先のcDNA溶液の1:1000希釈液 (1 μ L) に V_H -5及び V_H -3プライマー (V_H の増幅) 又は、 V_L -5及び V_L -3プライマー (V_L の増幅) (各30 pmol) 並びにEx-Taq DNA polymerase (2.5 U) を添加し、Ex-Taq用緩衝液 (100 μ L) 中でPCR [95℃、1分間; 50℃、1分間; 72℃、3分間 (35サイクル)、次いで72℃、10分間] を行った。得られた粗反応液を上記の低融点アガロースを用いる電気泳動に付して、約400 bpのバンドをWizard PCR preps DNA purification system (Promega) を用いて回収し、目的の V_H 遺伝子及び V_L 遺伝子断片を得た。引き続き、これら (各々200 ng) を混合してEx-Taq DNA polymerase (0.65 U) を加え、Ex-Taq用緩衝液 (25 μ L) 中でoverlap extension PCR [95℃、1分間; 55℃、1分間; 72℃、3分間 (10サイクル)、次いで72℃、10分間] を行い、scFv遺伝子を構築した。さらに本反応液の一部 (5 μ L) に V_H -5、 V_L -3プライマー (各100 pmol)、Ex-Taq DNA polymerase (2.5 U) を添加し、同条件 (ただし反応液100 μ L) で25サイクルのPCRを行ってscFv遺伝子を増幅した。得られた粗反応液を低融点アガロースによる電気泳動に付して、約800 bpのバンドを回収し、5' V_H - リンカー - V_L 3' の配列を有する目的のscFv遺伝子を得た (図 3)。

【 0 0 7 7 】

【発明の効果】

本発明により、抗可塑剤抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をコードする遺伝子のアミノ酸配列及び塩基配列が明らかとなった。本発明によって抗可塑剤抗体由来の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をコードする遺伝子を遺伝的に改変することが可能となる。例えば、改変遺伝子を宿主細胞内で発現させることにより、可塑剤の測定・定量・濃縮において、より好ましい性質を持った、可塑剤に結合能を有する蛋白質を大量に得ることが可能となる。また、この改変抗体遺伝子を有する組換え微生物等を使用することにより、組換え蛋白質を効率よく生産することも可能となる。さらに、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をコードする塩基配列にランダムな変異を導入してミュータント scFv のライブラリーを構築し、このライブラリー中から、可塑剤に対する親和性が元の抗体よりも大きい変異体を選択することにより、可塑剤に対する親和性が向上した組換え蛋白質を得ることが可能となる。以上により、性能の優れた酵素免疫測定法キットや抗体アフィニティーカラムをより安価に作製することが可能となる。

【0 0 7 8】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan EnviroChemicals, Ltd.

<120> A protin binding to plasticizers

<130> A5913

<160> 22

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 363

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(363)

<223>

<400> 1

gag gtg cat ctg gtg gag tct ggg gga gac tta gtg agg cct gga ggg 48

Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Arg Pro Gly Gly

1

5

10

15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc gga agt tat 96

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser Tyr

20

25

30

ggc atg tct tgg gtt cgc cag act gca gac aag agg ctg gag tgg gtc 144

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Ala Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val

35

40

45

gca acc att tat agt ggt ggt ttt tac acc tac tat cca gac agt gtg 192

Ala Thr Ile Tyr Ser Gly Gly Phe Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50

55

60

agg gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gtc aag gaa atc gtg tat 240

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Glu Ile Val Tyr

65

70

75

80

ctg caa atg agc agt ctg aag tct gag gac aca gcc atg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gca aga cgg acg gta gta tct acg gac tat act ttg gac tac tgg ggt 336
 Ala Arg Arg Thr Val Val Ser Thr Asp Tyr Thr Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

caa gga acc tca gtc atc gtc tcc tca 363
 Gln Gly Thr Ser Val Ile Val Ser Ser
 115 120

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Ala Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Tyr Ser Gly Gly Phe Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50

55

60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Glu Ile Val Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Arg Thr Val Val Ser Thr Asp Tyr Thr Leu Asp Tyr Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Ser Val Ile Val Ser Ser

115

120

<210> 3

<211> 318

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(318)

<223>

<400> 3

gat atc cag ata aca cag att aca tcc tcc ctg gct gcc tct ctg gga 48

Asp Ile Gln Ile Thr Gln Ile Thr Ser Ser Leu Ala Ala Ser Leu Gly

1

5

10

15

gac aga gtc acc atc agt tgc cgg cca agt cag gac atc agc aat ttt 96

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Pro Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe

20

25

30

tta aac tgg ttt cag cag aaa cca gat gga act gtt gaa gtc ctg atc 144

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Glu Val Leu Ile

35

40

45

tgc tac aca tta aga atg cac tta gga gtc cca tca acg ttc agt ggc 192

Cys Tyr Thr Leu Arg Met His Leu Gly Val Pro Ser Thr Phe Ser Gly

50

55

60

tgt gtg tct gga aca tat tat act ctc acc agt agc aac ctg gaa caa 240

Cys Val Ser Gly Thr Tyr Tyr Thr Leu Thr Ser Ser Asn Leu Glu Gln

65

70

75

80

gaa gat ata gac act tcc ttt gcc att agg att ata cgc gtg ctc acg 288

Glu Asp Ile Asp Thr Ser Phe Ala Ile Arg Ile Ile Arg Val Leu Thr

85

90

95

gtc ggt gca ggg acc acg ctg gag ctg aaa 318

Val Gly Ala Gly Thr Thr Leu Glu Leu Lys

100

105

<210> 4

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Asp Ile Gln Ile Thr Gln Ile Thr Ser Ser Leu Ala Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Pro Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe

20 25 30

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Glu Val Leu Ile

35 40 45

Cys Tyr Thr Leu Arg Met His Leu Gly Val Pro Ser Thr Phe Ser Gly

50 55 60

Cys Val Ser Gly Thr Tyr Tyr Thr Leu Thr Ser Ser Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

Glu Asp Ile Asp Thr Ser Phe Ala Ile Arg Ile Ile Arg Val Leu Thr

85 90 95

Val Gly Ala Gly Thr Thr Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Linker

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Ser

1

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Linker

<400> 6

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly

1

5

10

<210> 7

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Linker

<400> 7

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Ser Gly Ser Thr

1

5

10

15

Lys Gly

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Linker

<400> 8

Gly Ser Thr Ser Gly Lys Pro Ser Glu Gly Lys Gly

1 5 10

<210> 9

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Linker

<400> 9

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 10

gcttgccggg tgggccac

18

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 11

acactgctgg acagggat

18

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 12

ggatcccggg agtaccctt gaccaggc

28

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 13

gttgaagctc ttgacaat

18

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 14

ggatcccggg tggatggtgg gaagatg

27

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> 24

<223> i

<220>

<221> misc_feature

<222> 25

<223> i

<220>

<221> misc_feature

<222> 29

<223> i

<220>

<221> misc_feature

<222> 30

<223> i

<220>

<221> misc_feature

<222> 34

<223> i

<220>

<221> misc_feature

<222> 35

<223> i

<400> 15

ggccacgcgt cgactagtac gggnnngggnn gggng

3

6

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 16

ggccacgcgt cgactagtac

20

<210> 17

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 17

actagtcgac atggtrtccw casctcagtt ccttg

35

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 18

ggaaacagct atgaccatg

19

<210> 19

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 19

gtaaaacgac ggccagt

17

<210> 20

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 20

attgttatta ctcgcggccc aaccggccat ggccgaggtg catctggtgg agtctggg 58

<210> 21

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 21

ccgccggtac cacctccgcc tgaaccgcct ccacctgagg agacgatgac tgaggttcc 59

<210> 22

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 22

caggcggagg tggatccggc ggtggcggat cggatatcca gataacacag attacca 56

<210> 23

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 23

gctcaacttt cttgtcgact ttatcatcat catctttata atctttcagc tccagcgtgg 60

tccctgc 67

【図面の簡単な説明】

【図 1】

抗可塑剤抗体重鎖の塩基配列及びアミノ酸配列を示す図である。

【図 2】

抗可塑剤抗体軽鎖の塩基配列及びアミノ酸配列を示す図である。

【図 3】

抗可塑剤抗体重鎖及び軽鎖を有する単鎖抗体遺伝子のアガロースゲル電気泳動を示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】

GAG GTG CAT CTG GTG GAG TCT GGG GGA GAC TTA GTG AGG CCT GGA
glu val his leu val glu ser gly gly asp leu val arg pro gly

GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC GGA
gly ser leu lys leu ser cys ala ala ser gly phe thr phe gly

← CDR1 →
AGT TAT GGC ATG TCT TGG GTT CGC CAG ACT GCA GAC AAG AGG CTG
ser tyr gly met ser trp val arg gln thr ala asp lys arg leu

← CDR2 →
GAG TGG GTC GCA ACC ATT TAT AGT GGT GGT TTT TAC ACC TAC TAT
glu trp val ala thr ile tyr ser gly gly phe tyr thr tyr tyr

→
CCA GAC AGT GTG AGG GGA CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GTC
pro asp ser val arg gly arg phe thr ile ser arg asp asn val

AAG GAA ATC GTG TAT CTG CAA ATG AGC AGT CTG AAG TCT GAG GAC
lys glu ile val tyr leu gln met ser ser leu lys ser glu asp

← CDR3 →
ACA GCC ATG TAT TAC TGT GCA AGA CGG ACG GTA GTA TCT ACG GAC
thr ala met tyr tyr cys ala arg arg thr val val ser thr asp

→
TAT ACT TTG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ATC GTC TCC
tyr thr leu asp tyr trp gly gln gly thr ser val ile val ser

TCA

ser

【図2】

GAT ATC CAG ATA ACA CAG ATT ACA TCC TCC CTG GCT GCC TCT CTG
asp ile gln ile thr gln ile thr ser ser leu ala ala ser leu

GGA GAC AGA GTC ACC ATC AGT TGC CGG CCA AGT CAG GAC ATC AGC
gly asp arg val thr ile ser cys arg pro ser gln asp ile ser

AAT TTT TTA AAC TGG TTT CAG CAG AAA CCA GAT GGA ACT GTT GAA
asn phe leu asn trp phe gln gln lys pro asp gly thr val glu

GTC CTG ATC TGC TAC ACA TTA AGA ATG CAC TTA GGA GTC CCA TCA
val leu ile cys tyr thr leu arg met his leu gly val pro ser

ACG TTC AGT GGC TGT GTG TCT GGA ACA TAT TAT ACT CTC ACC AGT
thr phe ser gly cys val ser gly thr tyr tyr thr leu thr ser

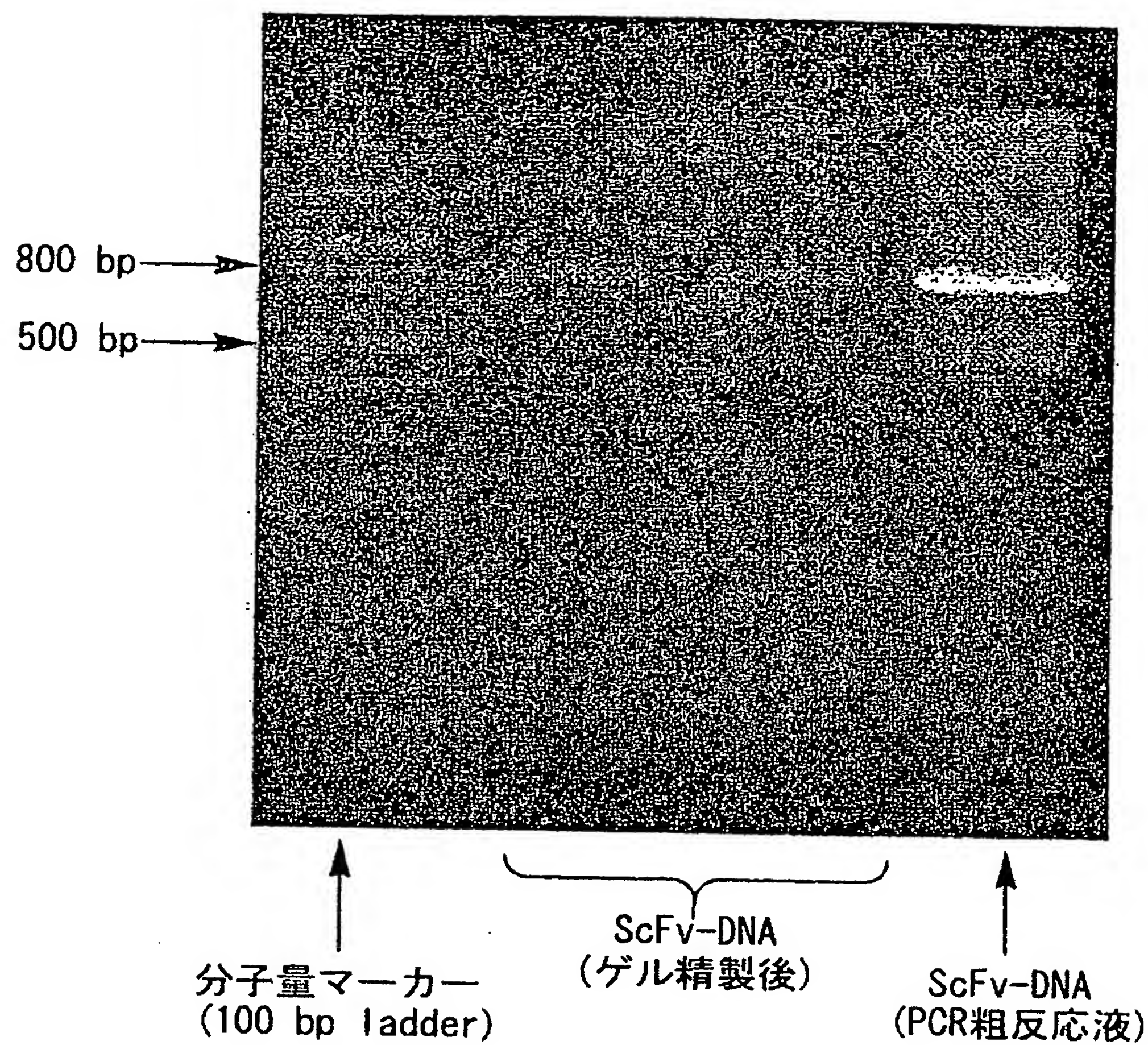
AGC AAC CTG GAA CAA GAA GAT ATA GAC ACT TCC TTT GCC ATT AGG
ser asn leu glu gln glu asp ile asp thr ser phe ala ile arg

ATT ATA CGC GTG CTC ACG GTC GGT GCA GGG ACC ACG CTG GAG CTG
ile ile arg val leu thr val gly ala gly thr thr leu glu leu

AAA

lys

【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 可塑剤の測定・定量や濃縮に際し、感度の良い、交叉反応性の少ない、妨害物質の影響を受けにくい、溶媒による影響を受けにくい等の有用な性質を付加した、可塑剤に対する結合能を有する蛋白質の提供。

【解決手段】 抗原としての可塑剤に対する親和性、抗原結合能、交叉反応性、抗原抗体反応妨害物質耐性、酵素発色反応妨害物質耐性、溶媒耐性等の種々の性質を遺伝子組換え技術により向上させた改変蛋白質。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 1 1 0 8 7 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 1 4 0 0 5 6]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 4 月 1 5 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町二丁目 3 番 8 号

氏 名

日本エンバイロケミカルズ株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.